G. PATRASSI

Rispettoso omaggio
Patrassi
Firenze, 17-X-'31. IX°

Il microincenerimento dei tessuti

come mezzo d'indagine istobiochimica

634

DAL N. 10 DELLA RIVISTA MENSILE
DIAGNOSTICA E TECNICA DI LABORATORIO
OTTOBRE 1930 (VIII) — NAPOLI

DIAGNOSTICA
E
TECNICA DI LABORATORIO

RIVISTA MENSILE

VOL. I — 25 OTTOBRE 1930 - VIII — N. 10

TECNICA

IL MICROINCENERIMENTO DEI TESSUTI COME MEZZO D' INDAGINE ISTOBIOCHIMICA

DOTT. G. PATRASSI

(*Berlino*)

L' importanza che alcuni ioni minerali (Fe , Ca , K , ecc.) hanno assunto nella biologia delle cellule e dei tessuti e la difficoltà da essi opposta ad una esatta e completa dimostrazione istochimica giustificano la ricerca di adeguati procedimenti tecnici che diano affidamento sicuro sui loro risultati. È così che negli ultimi decenni, ad opera sopratutto di POLICARD e di alcuni studiosi della scuola di Basilea (TSCHOPP, SCHULTZ-BRAUNS), è stato escogitato e proposto un metodo d' indagine, che attraverso il completo incenerimento delle sezioni istologiche mira a porre in evidenza i vari componenti minerali delle strutture organizzate.

Già applicato con successo nel secolo scorso in botanica da MOLISCH ed esteso da LIESEGANG allo studio dei tessuti animali (più specialmente alla dimostrazione del ferro di provenienza ematica), il metodo del microincenerimento, se non può ancora considerarsi come entrato nella pratica quotidiana , rappresenta un contributo notevole alla

soluzione degli intricati problemi fisiochimici inerenti alla biologia tissulare.

Il presupposto teorico e pratico di questa metodica è rappresentato dalla possibilità del riconoscimento delle fette incenerite nelle loro particolarità istologiche fondamentali senza spostamento dei composti minerali dal loro substrato organico. In linea di massima è reso possibile, quindi, il raffronto fra struttura del tessuto da un lato, quantità e caratteri delle ceneri dall' altro. Appunto in considerazione di queste finalità pratiche SCHULTZ-BRAUNS ha riunito questi metodi di ricerca sotto il nome di « istotopochimica », mentre POLICARD (adottando in sostanza la nomenclatura proposta da TSCHOPP) preferisce per essi il termine di « istospodografia « (da σποδὸς = cenere).

Le manualità tecniche del metodo dalle prime ricerche di LIESEGANG ad oggi sono andate man mano complicandosi, allo scopo di consentire una maggiore delicatezza ed attendibilità di risultati. LIESEGANG praticava l'incenerimento di sezioni montate in glicerina albuminata mediante un semplice becco BUNSEN. Attualmente è necessario ricorrere ad un apposito strumentario che può essere allestito senza eccessive difficoltà, quando non lo si voglia prelevare dal commercio.

Le fette istologiche destinate all'incenerimento possono essere preparate o previa inclusione in paraffina o mediante semplice sezione al microtomo congelatore di pezzi fissati o no. OSTERTAG crede consigliabile anche l'inclusione in celloidina.

Condizione « *sine qua non* » per un'esatta applicazione del metodo è che il pezzo o le sezioni non vengano in nessun momento a contatto con liquidi suscettibili di alterare i componenti minerali del tessuto. Sono quindi da proscrivere i fissativi a base di acidi o di sali inorganici (liquido di ZENKER, ecc.). Anche il passaggio delle sezioni in acqua per il montaggio sui vetrini deve essere praticato con la massima rapidità, o meglio si può sostituire l'acqua con olio di paraffina.

L' inclusione in celloidina o paraffina si effettua come di norma, senza necessità di apposite modificazioni. Più complicata, ma preferibile perchè evita il passaggio del tessuto attraverso una serie di liquidi (alcool, xilolo) di cui non si può esattamente apprezzare l' influenza sulla composizione chimica del tessuto, è la sezione al congelatore di pezzi freschi. La difficoltà pratica più grave consiste nella necessità di raffreddarne la lama, al fine di evitare che le albumine non fissate incollino le fette sul coltello: ad evitare ciò SCHULTZ-BRAUNS ha applicato a quest'ultimo un secondo sistema refrigeratore del tutto analogo a quello che

assicura la congelazione del blocchetto. (La ditta E. LEITZ-WETZLAR ha costruito dietro suo consiglio un dispositivo adatto). In tal modo si allestiscono sezioni dello spessore di 15 μ, che ancora congelate vengono portate con l'aiuto di pinzette raffreddate su portaoggetti convenientemente puliti. Con tale accorgimento si evita un passaggio attraverso ogni liquido solvente. A parere di POLICARD, del resto, è lecito raccogliere le fette in acqua e montarle rapidamente sui vetrini, senza che intervengano apprezzabili alterazioni nella loro composizione chimica.

Qualunque procedimento si adotti per l'allestimento delle fette, alcune avvertenze devono esser tenute sempre presenti: 1.° È preferibile che le fette abbiano il minimo spessore possibile, perchè in tal modo si assicura la massima chiarezza all'immagine spodoscopica. 2.° Tutte le fette devono avere l'identico spessore, perchè risulti autorizzato il confronto dei preparati per la valutazione del quantitativo di ceneri. 3.° Per ogni fetta destinata all'incenerimento è necessario conservarne una contigua da trattarsi con gli usuali metodi di colorazione, al fine di accertare e controllare la topografia delle ceneri.

I portaoggetti più indicati, perchè più resistenti all'azione del calore, risultano nella pratica quelli in vetro verde un po' spesso (POLICARD).

Le fette così allestite e montate vengono sottoposte in un forno elettrico all' operazione dell' incenerimento. È questo il tecnicismo più delicato ad attuarsi, se si vogliono ottenere dei quadri chiari e di facile interpretazione.

Il forno elettrico *(v. fig. 1)* è costituito sostanzialmente da un tubo di

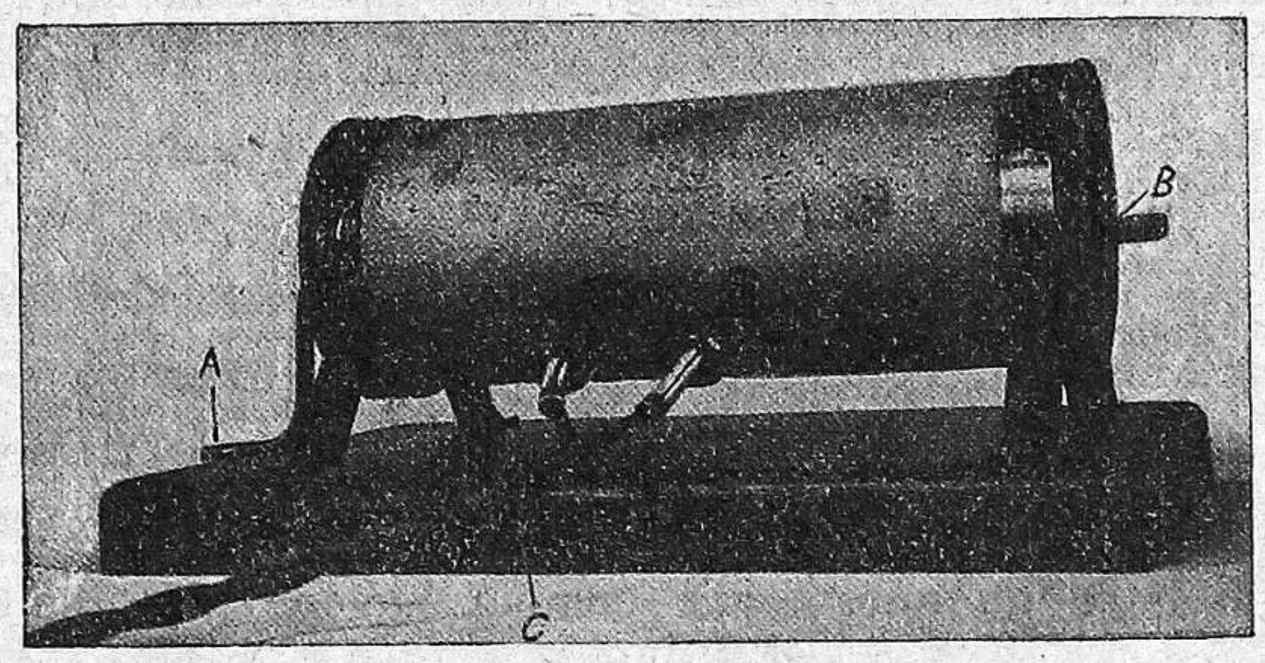

Fig. 1. — Forno elettrico per l'incenerimento delle sezioni.
(Da TSCHOPP in *Handb. d. mikrosk. Anat.*, Vol. 1°, Edit. Springer).

quarzo (le cui dimensioni sono all'incirca di mm. 30 di diametro e mm. 100 di lunghezza) riscaldato elettricamente fino al calor rosso per mezzo di una

spirale di platino circondata da un involucro isolante di amianto e munito di un reostato regolatore: nell'interno di esso è situato un supporto (di platino, eternit o porcellana non vetrificata), sul quale vengono posti i portaoggetti. [Modelli di tale apparecchio sono costruiti dalla ditta COUPRIE di Lione su disegno di POLICARD]. Si può favorire od accelerare il processo di combustione, introducendo nell'apparecchio mediante apposito dispositivo piccole quantità di ossigeno. Il riscaldamento deve esser lento e non superare mai i 600° per assicurare un incenerimento regolare e completo: in tal modo la sezione annerisce a poco a poco fino a totale carbonizzazione per assumere più tardi una tinta biancastra uniforme, indizio di ultimata mineralizzazione. La durata del trattamento varia a seconda del tessuto e si aggira intorno ai 15'. Le fette così incenerite sono pronte per l'osservazione.

Secondo TSCHOPP, è opportuno cimentarle con il colore acido della iodeosina sciolto in etere: lo scheletro minerale si tinge allora in rosso, assumendo un particolare risalto.

La protezione della fetta è attuata da POLICARD mediante un coprioggetti separato dal piano del portaoggetti da strisce raddoppiate di carta nera e fissato tutt' intorno da paraffina. TSCHOPP ritiene consigliabile il montaggio in soluzione di etere-collodio allo 0,1 $^0/_0$, alla quale aggiunge un paio di gocce di olio di ricino. JACOBI & KEUSCHER montano in balsamo.

L'osservazione dei preparati così allestiti può essere fatta con un comune microscopio, meglio con un binoculare per avere la visione stereoscopica delle ceneri. Indispensabile è un sistema d'illuminazione a luce riflessa su fondo nero (illuminatore opaco ZEISS): lo si può realizzare, facendo cadere sullo schermo nero un fascio di luce proveniente da una lampada ad arco situata di lato.

Le ceneri appaiono allora (quando non siano state sottoposte a trattamenti coloranti) di colore bianco-grigiastro o rossastro e in quantità variabile a seconda del tessuto e nei vari punti dello stesso preparato.

Il paragone con le fette contigue colorite con i metodi ordinari o con schemi tratti da queste alla camera lucida ci permetterà l'esatto riferimento topografico dei depositi di ceneri *(v. figg. 2 e 3)*.

Gli elementi di giudizio, che possono ricavarsi dalla semplice osservazione spodoscopica, devono essere integrati dalla indagine chimica qualitativa delle ceneri. Ed è su questo punto che la spodoscopia rivela tuttora le manchevolezze più gravi.

Dei vari elementi che prendono parte alla costituzione delle ceneri il *magnesio* ad esempio, secondo POLICARD, non è suscettibile finora di una sicura dimostrazione, mentre per il *silicio* lo stesso autore propone di utilizzare il suo carattere birifrangente dopo il riscaldamento. Per il *sodio* SCHULTZ-BRAUNS ritiene applicabile il metodo microanalitico al *cesio-bismuto*, mentre JACOBI & KEUSCHER mettono in evidenza il *potassio* per mezzo di cloruro di platino al 10 % ed acido cloridrico, sotto forma di cristalli rifrangenti ottaedrici o esaedrici di cloroplatinato di potassio.

Di importanza istopatologica ben maggiore è l'identificazione del

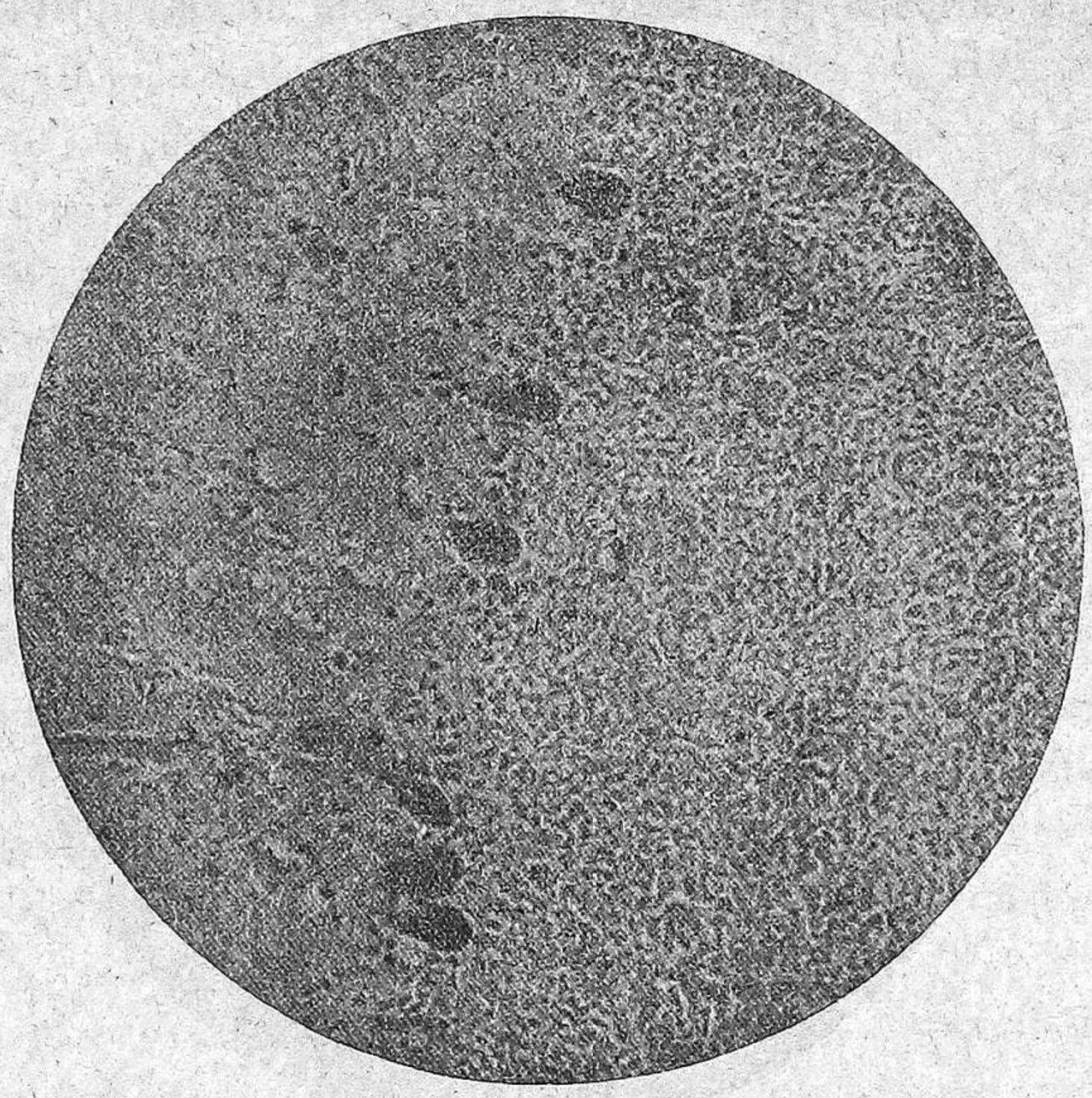

Fig. 2. — Microspodogramma della corteccia cerebellare: le cellule del PURKINJE sono chiaramente identifi cabili per il notevole contenuto in ceneri. (Da TSCHOPP in *Handb. d. mikrosk. Anat.*, Vol. I°, Edit. Springer).

ferro e del *calcio*. Quanto al primo, solo il criterio colorimetrico ha un valore effettivo: le ceneri di un tessuto particolarmente ricco in Fe sono giallo-rosse fino a rosso-vive in ragione della quantità maggiore o minore di ossido ferrico in esse contenuto. Il Ca può essere dimostrato sottoponendo le ceneri all'azione di acido solforico diluito: se alla loro

costituzione prendono parte sali di Ca, si formano i caratteristici cristalli aghiformi di solfato di Ca. A tale metodo applicato da MACALLUM e da JACOBI & KEUSCHER altri autori (SCHULTZ-BRAUNS, SCHEID) preferiscono l'altro che consiste nell' estrarre dalle ceneri i sali degli altri elementi mediante trattamento con acqua distillata, in cui essi sono più solubili dei composti del Ca : questi ultimi rimangono così gli unici componenti del quadro spodografico.

Qual' è in sostanza il valore teorico e pratico della istospodografia ?

È certamente prematuro fissarne i limiti e precisarne le attribuzioni fino a che una più estesa applicazione ai vari distretti dell' anatomia normale e patologica ci abbia permesso di ampliare le conoscenze acquisite con questo metodo. Ad ogni modo, anche i pochi contributi, di cui finora dispone la letteratura, in parte valgono a consolidare nozioni già per altra via accertate, in parte risultano di constatazioni, delle quali non è possibile per ora valutare con precisione la portata.

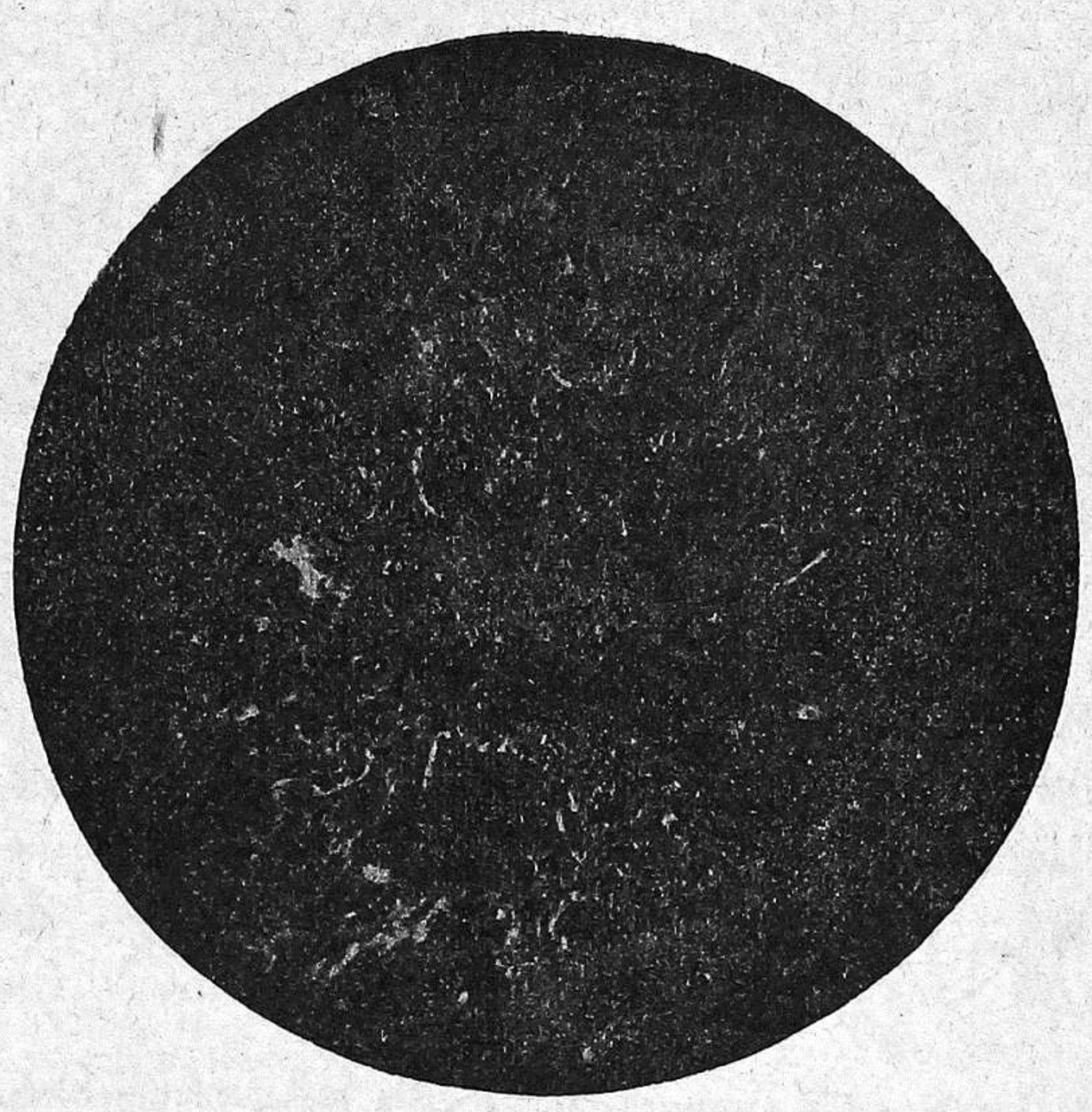

Fig. 3. — Microspodogramma del polmone di un vecchio di 80 anni: forte aumento di ceneri nelle pareti alveolari.
(Da SCHULTZ-BRAUNS, *Virchows Arch.*, Vol. 273, Edit. Springer).

Così, se non deve meravigliare, in vista di ciò che anche l'analisi chimica grossolana aveva riconosciuto, il reperto di SCHULTZ-BRAUNS che fra i tessuti viventi con tasso di ceneri particolarmente forte siano il tessuto connettivo cicatriziale, la sostanza fondamentale cartilaginea e il tessuto elastico, di grande interesse appare invece la constatazione fatta dallo stesso autore che l'aorta fornisce un quantitativo di ceneri progressivamente crescente con l'avanzare dell'età. Analogamente il tessuto polmonare, mentre nel bambino e nel giovane risultava poco ricco di ceneri, nel vecchio presentava abbondanti quantità di calcio (SCHULTZ-BRAUNS), modificazione da riferirsi indubbiamente allo scheletro elastico delle pareti alveolari. SCHEID a sua volta osservava che le cellule nervose gangliari presentano un deposito di ceneri di gran lunga maggiore di quello degli elementi epiteliali ed ectodermici di altri organi (epidermide, rene, fegato, ecc.).

Ma non è soltanto all'istopatologia in genere che il metodo spodografico può essere applicato con successo. Anche la citologia si è per esso arricchita di dati interessanti: così POLICARD ha potuto accertare che il nucleo cellulare è in genere molto più ricco in ceneri del citoplasma.

Certo è che l'importanza del metodo e dei suoi risultati è di ordine *biologico* ancor più che *morfologico* e che per questo esso si differenzia nettamente da quelli più strettamente istochimici. Difatti, quando con i comuni procedimenti dimostriamo la presenza ad es. di composti calcarei o di pigmento emosiderinico più o meno abbondanti nei tessuti, noi osserviamo il processo di evoluzione chimica nel suo stadio ultimo e, per così dire, non più vitale: noi identifichiamo infatti il Ca ed il Fe in genere solo quando essi sono stati eliminati, « sequestrati » dalla compagine vitale del tessuto sotto forma di precipitati a morfologia variabile. Ora, questa « fanerosi » fisiopatologica dei composti minerali non può orientarci con molta precisione su quello che è il *metabolismo minerale in atto*. Così anche di recente si è tentato di porre in evidenza il cosiddetto « ferro occulto » dei tessuti (sia esso legato alle molecole proteiche, sia esso allo stato di composto inorganico colloidale) mediante speciali modificazioni dei metodi finora utilizzati per il pigmento ematogeno (KOCKEL). Il metodo spodografico sotto questo riguardo, se pure non può fornirci risultati di indole qualitativa, se cioè non può rivelarci sotto quale forma ed in quali rapporti con lo scheletro albuminoso dei tessuti si trovino i gruppi mi-

nerali, permette tuttavia di riconoscere in base alle oscillazioni del tasso di ceneri gli spostamenti quantitativi del metabolismo minerale.

Un'altra applicazione del metodo può essere costituita dalla identificazione di elementi minerali, che normalmente non si trovano in quantità apprezzabili nei tessuti. Sull'esempio di SEYFERT, che per tale via dimostrò nel corso di ricerche sperimentali la presenza di depositi di *piombo* nella parete aortica, l'incenerimento delle fette può riuscire di utile complemento agli attuali metodi di indagine istologica e medico-legale per la dimostrazione, oltrechè del *piombo*, anche del *mercurio*, dell'*argento* e degli altri *metalli*.

Tali sono allo stato attuale i vantaggi e le lacune del metodo spodografico, il cui valore generico può essere variamente apprezzato ma non misconosciuto. La sua innegabile utilità lascia sperare che esso trovi sempre più larga applicazione in avvenire, specialmente quando procedimenti chimici più delicati avranno consentito di pervenire alla precisa identificazione dei vari composti inorganici: allora potrà veramente parlarsi dell'istospodografia come di una felice sintesi del quadro morfologico e dell'accertamento chimico.

RIASSUNTO

L'A. passa in rassegna le conoscenze attuali sul metodo dell'incenerimento delle sezioni istologiche per lo studio biochimico dei tessuti (« spodografia »).

RÉSUMÉ

L'A. expose dans une revue générale l'état actuel de nos connaissances sur la méthode de l'incinération des coupes histologiques pour l'étude biochimique des tissus (« spodographie »).

SUMMARY

The Author summarises the actual knowledge and results obtained up to date, with the method of the incineration of histological sections for the histochemical study of tissues (« spodography »).

ZUSAMMENFASSUNG

Der A. gibt einen Ueberblick über die bisherigen Kenntnisse und Resultate mit der Methode der Veraschung histologischer Schnitte zur histologisch-chemischen Untersuchung der Gewebe (« Spodographie »).

BIBLIOGRAFIA

JACOBI e KEUSCHER. — Ueber den mikrochemischen Kalium–und Calciumnachweis im histologischen Schnitt. *Arch. f. Psych.* Vol. 79, 1927.

LIESEGANG. — Die Veraschung von Mikrotomschnitten. *Biochem. Zeitschr.* Vol. 28, 1910.

OSTERTAG. — Ueber die Veraschung des histologischen Schnittes zur Anstellung histochemischer Reaktionen am Zentralnervensystem. *Arch. f. Psych.*, Vol. 80, 1927.

POLICARD. — La microincinération des cellules et des tissus. *Protoplasma*, Vol. 7, N. 3, 1929 (Bibliogr.).

SCHEID. — Histologische Studien am Gehirn mit Hilfe der Schnittveraschung. *Virchows Arch.*, Vol. 277, N. 3, 1930.

SCHULTZ-BRAUNS. — Histo-topochemische Untersuchungen an krankhaft veränderten Organen unter Anwendung der Schnittveraschung. *Virchows Arch.* Vol. 273, N 1, 1929 (Bibliogr.).

TSCHOPP. — Die Localisation anorganischer Substanzen in den Geweben (Spodographie). *Handb. d. mikrosk. Anat. d. Menschen.* Vol. 1, N. 1, Edit. SPRINGER, Berlin, 1929.

(*manoscritto pervenuto in redazione il 9 agosto 1930*)

Prem. Stab. Tipogr.
N. JOVENE - NAPOLI
Via Donnalbina, 14.
Telef. 22107